

# FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE

Fluorescenční metody ve vědách o životě – cesta od molekuly k buňce

C7230

Ctirad Hofr

LifeB – Laboratoř interakce a funkce esenciálních **Biomolekul**


FGP – Funkční genomika a proteomika

NCBR – Národní centrum výzkumu biomolekul

Přírodovědecká fakulta | Masarykova univerzita

MUNI  
SCI

Národní centrum  
pro výzkum  
biomolekul



20  $\mu\text{m}$

This fluorescence microscopy image shows a biological specimen with two distinct signals. The red signal is concentrated in a central, elongated structure, while the green signal outlines its periphery and is also present in smaller, scattered spots. A scale bar in the top right corner indicates a length of 20 micrometers.

# Využití fluorescence, Přímá fluorescence, Přímá a Nepřímá fluorescence, Biotin-Avidinová metoda imunofluorescence

Fluorescenční metody se používají především, pokud potřebujeme zviditelnit určité látky a struktury v buňce. Některé fluorochromy (DAPI, ethidium bromid, Hoechst) se sami o sobě vážou na určité molekuly (např. na DNA) a můžeme je tedy použít na zviditelnění těchto molekul. Tento postup se nazývá **přímá fluorescence**.

Pro většinu struktur v buňce bychom však nenašli fluorofor, který by se na ně specificky vázal. V takovém případě používáme metody **imunofluorescence**. Jsou vypracovány postupy, s jejichž pomocí si dokážeme vyrobit protilátku, která se specificky váže na téměř jakýkoli druh molekuly. Máme-li takovou protilátku, můžeme na ni kovalentně navázat fluorofor a vyrobit tak fluoreskující molekulu specificky rozeznávající to, co potřebujeme. V tomto případě hovoříme o přímé imunofluorescenci.

Příprava takovéto kombinované molekuly (konjugátu) není úplně jednoduchá, a proto se často používá **nepřímá imunofluorescence**. U této metody si nejdříve připravíme v určitém zvířecím druhu (např. v králíkově) specifickou protilátku proti naší molekule (primární protilátka) a necháme ji navázat na molekulu nebo strukturu, kterou chceme lokalizovat. Po odmytí přebytečné primární protilátky se na preparát přidá komerčně dodávaná protilátka konjugovaná s fluoroforem, která specificky rozeznává všechny protilátky daného zvířecího druhu (v našem případě králíka). Ta se naváže na primární protilátku a zviditelní námi hledanou strukturu. Nevýhodou nepřímé fluorescence oproti přímé fluorescenci je nižší specifita.

**Biotin-avidinová imunofluorescence** využívá silné vazby biotinu a bazického glykoproteinu avidinu. Biotin lze snadno navázat na molekuly primárních protilátek, na které se pak místo sekundárních protilátek s fluoroforem váže fluoroforem značený avidin. Výsledkem je jasná a ostrá fluorescence.

Protože máme k dispozici celé barevné spektrum fluoroforů, můžeme zviditelnit více různých struktur v téže buňce a sledovat tak jejich vzájemnou lokalizaci.

# Fluorescenční mikroskop

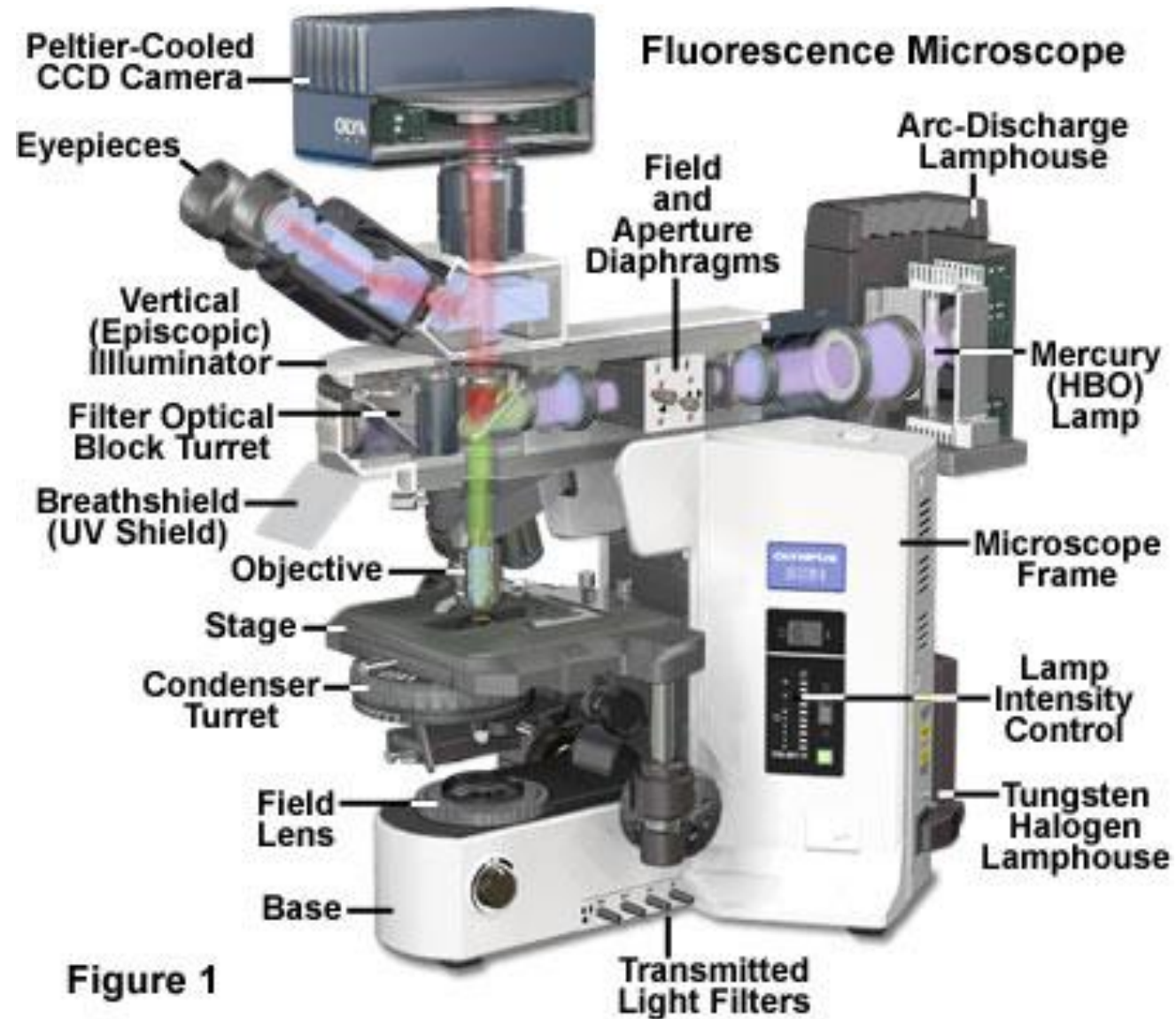
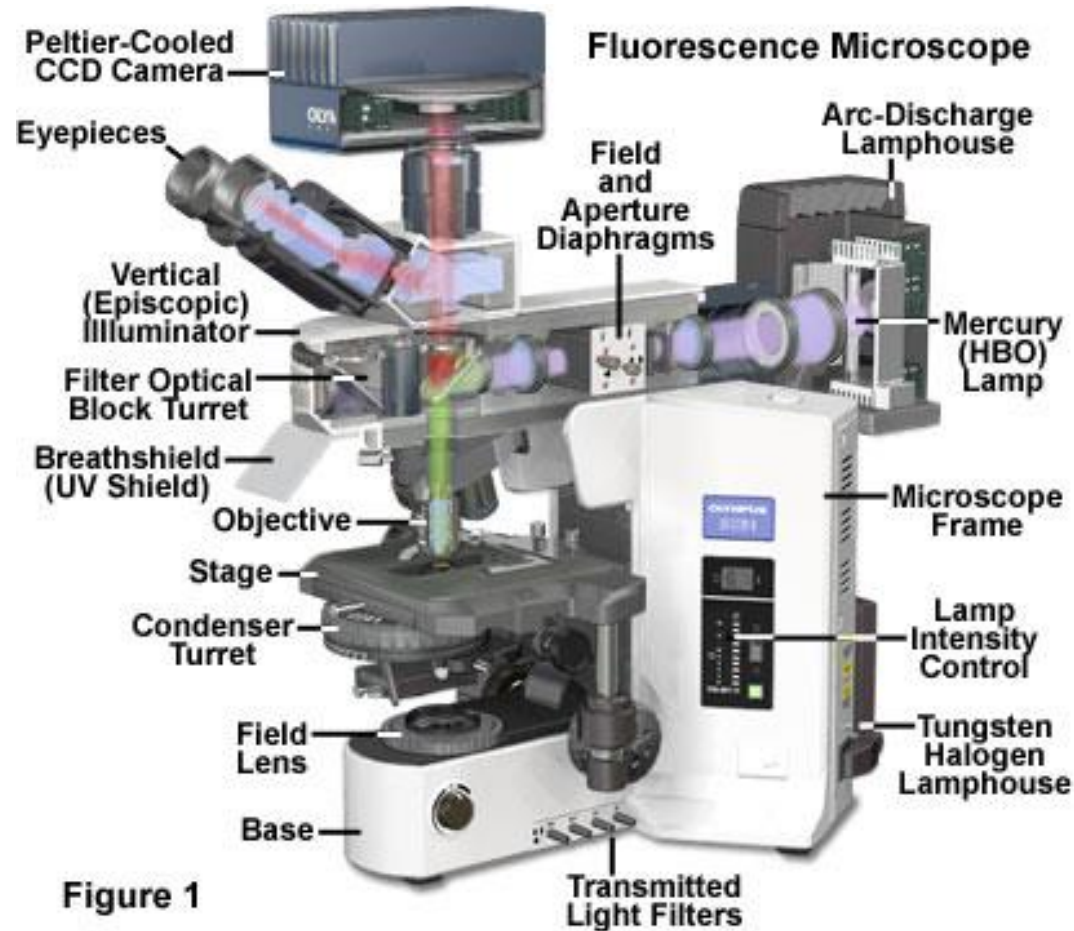


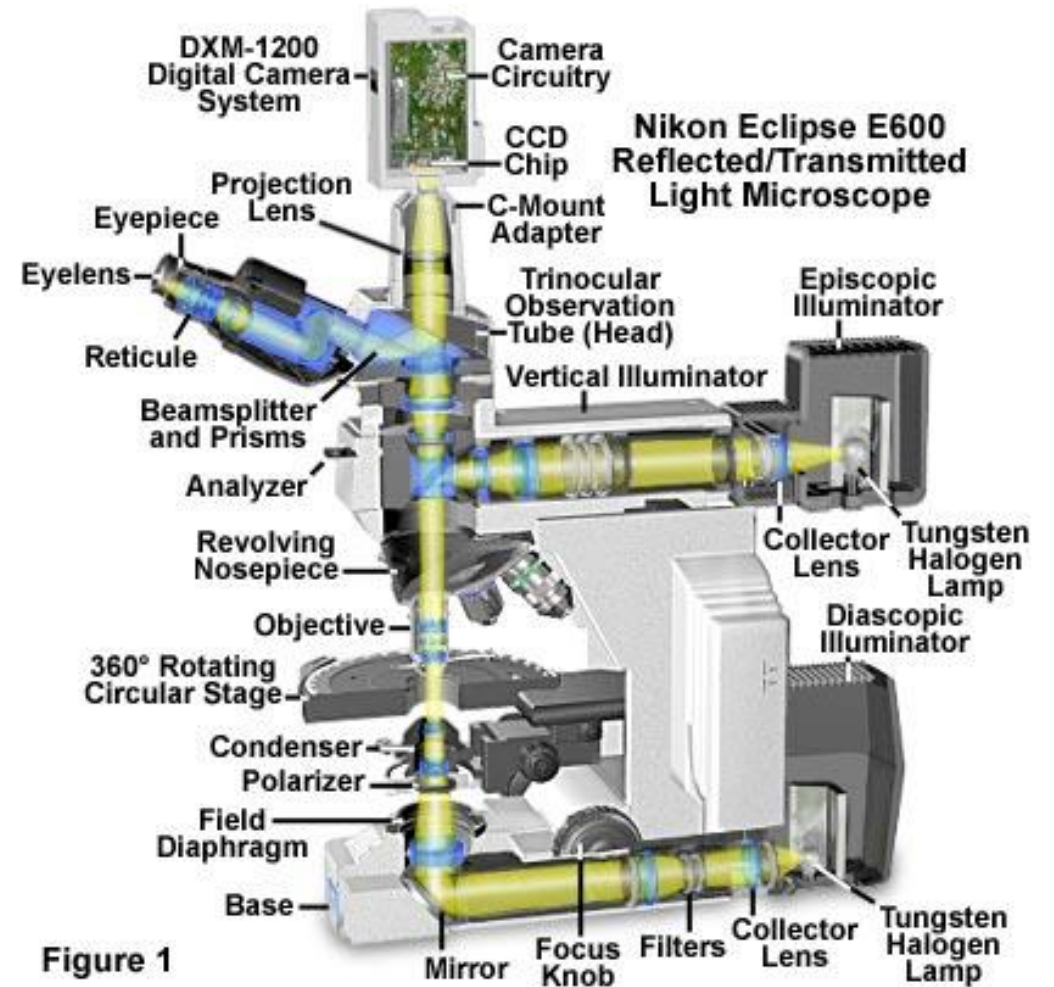
Figure 1

# Možné uspořádání

## Epifluorescenční mikroskop

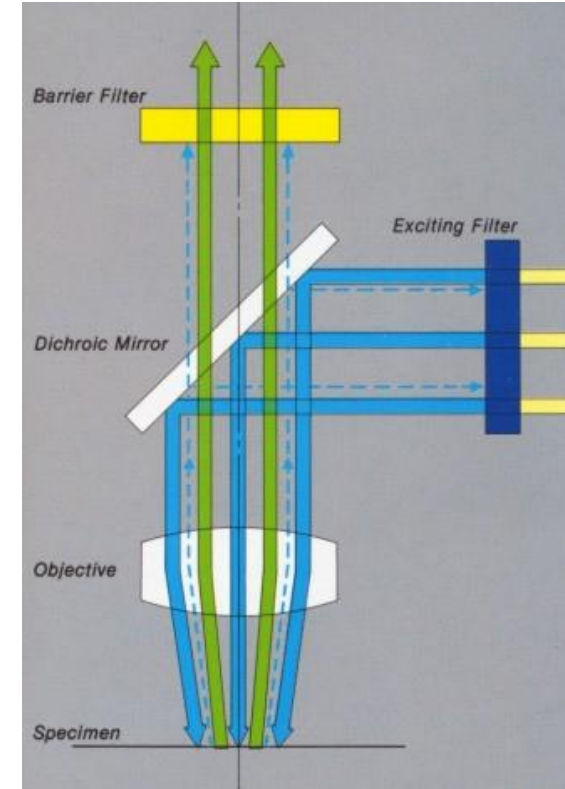
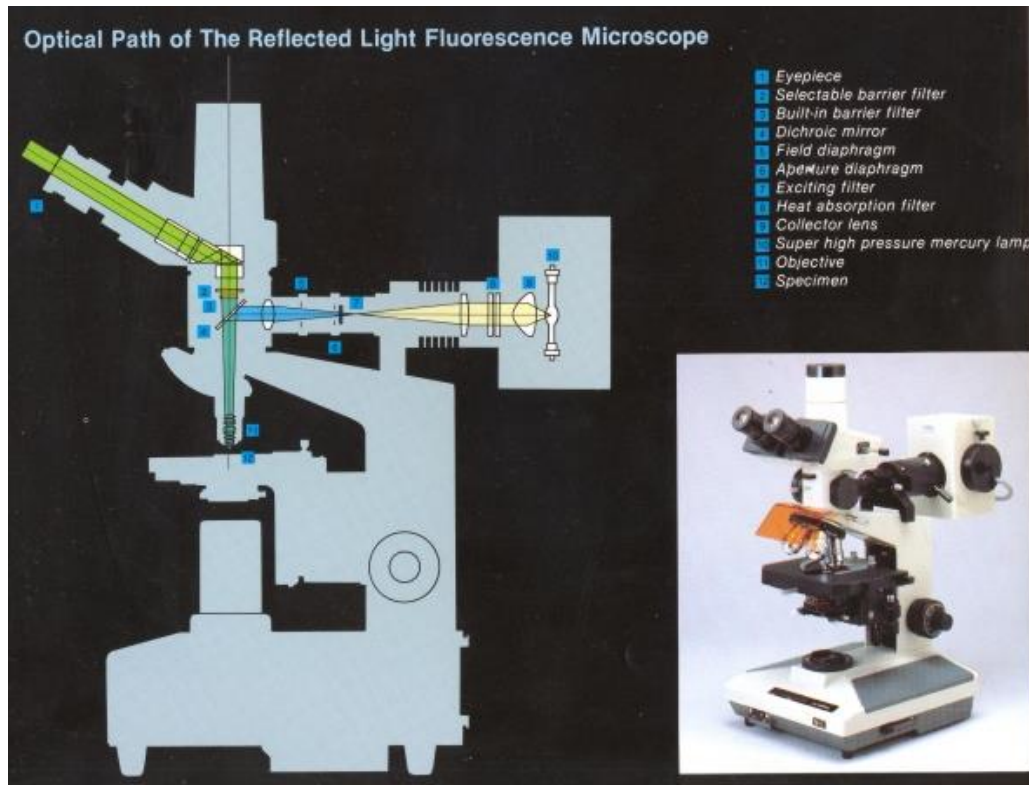


## Transmisní mikroskop



# Epifluorescenční mikroskop (Reflected light fluorescence microscope)

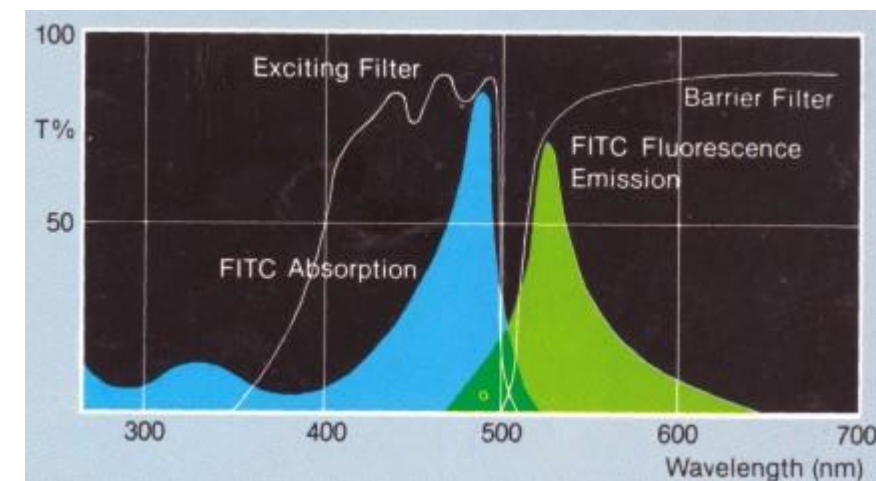
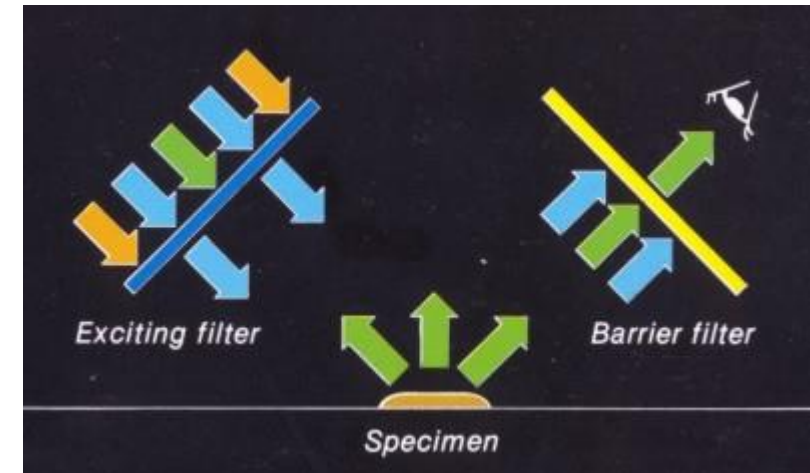
microscope)



- excitační světlo prochází objektivem, dopadá na preparát a emisní světlo se vrací zpět do objektivu
- nutno použít zvláštní typ zrcadla, které odráží excitační světlo do objektivu a propouští emisní světlo do okuláru
- používá se **dichroické zrcadlo**, které propouští a odráží světlo podle toho, jakou má vlnovou délku. Používá se tedy vždy takový typ zrcadla, který maximum excitačního světla odráží a maximum emisního světla propouští.
- epifluorescenční typ mikroskopu je v současnosti více oblíbený než transmisní typ

# Excitační a barierový (emisní) filtr

- Abychom mohli dobře pozorovat emisní záření jehož intenzita je vždy nižší než intenzita excitačního záření, používáme dvojici filtrů.
- **Excitační filtr** propouští z barevného spektra pouze část potřebnou pro excitaci fluorescence a zabraňuje průchodu světla o stejné či podobné vlnové délce jako světlo emisní, které by vytvářelo pozadí.
- **Bariérový filtr** propouští pouze emisní část spektra a zabraňuje průchodu excitačního světla. Excitační světlo se od emisního sice liší barvou, ale je mnohem intenzivnější, takže by v něm fluorescenční emisní světlo, o které nám zejména jde, nebylo lidským okem rozlišitelné.

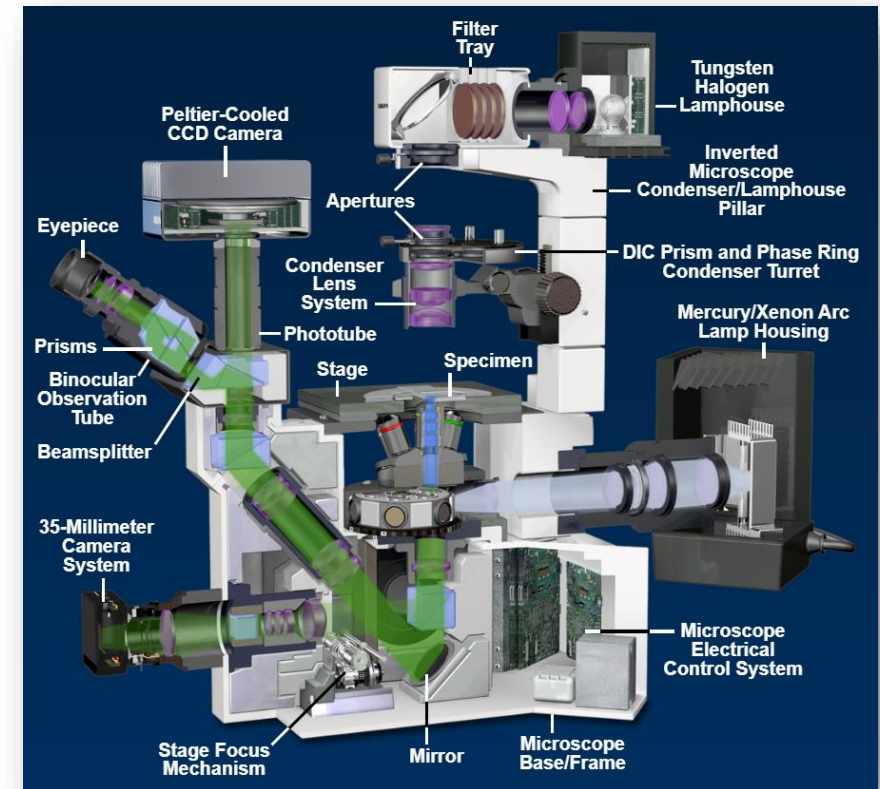
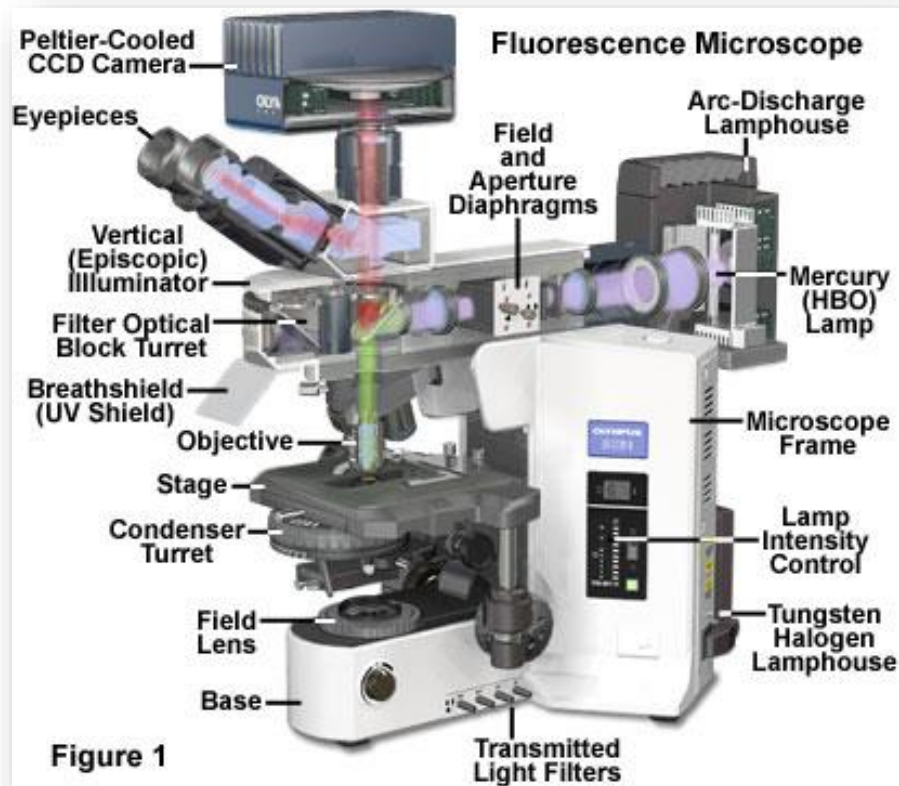


<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/fluorescence/opticalpaths/index.html>

# Anatomie mikroskopu

Klasický epifluorescenční mikroskop  
objektiv shora

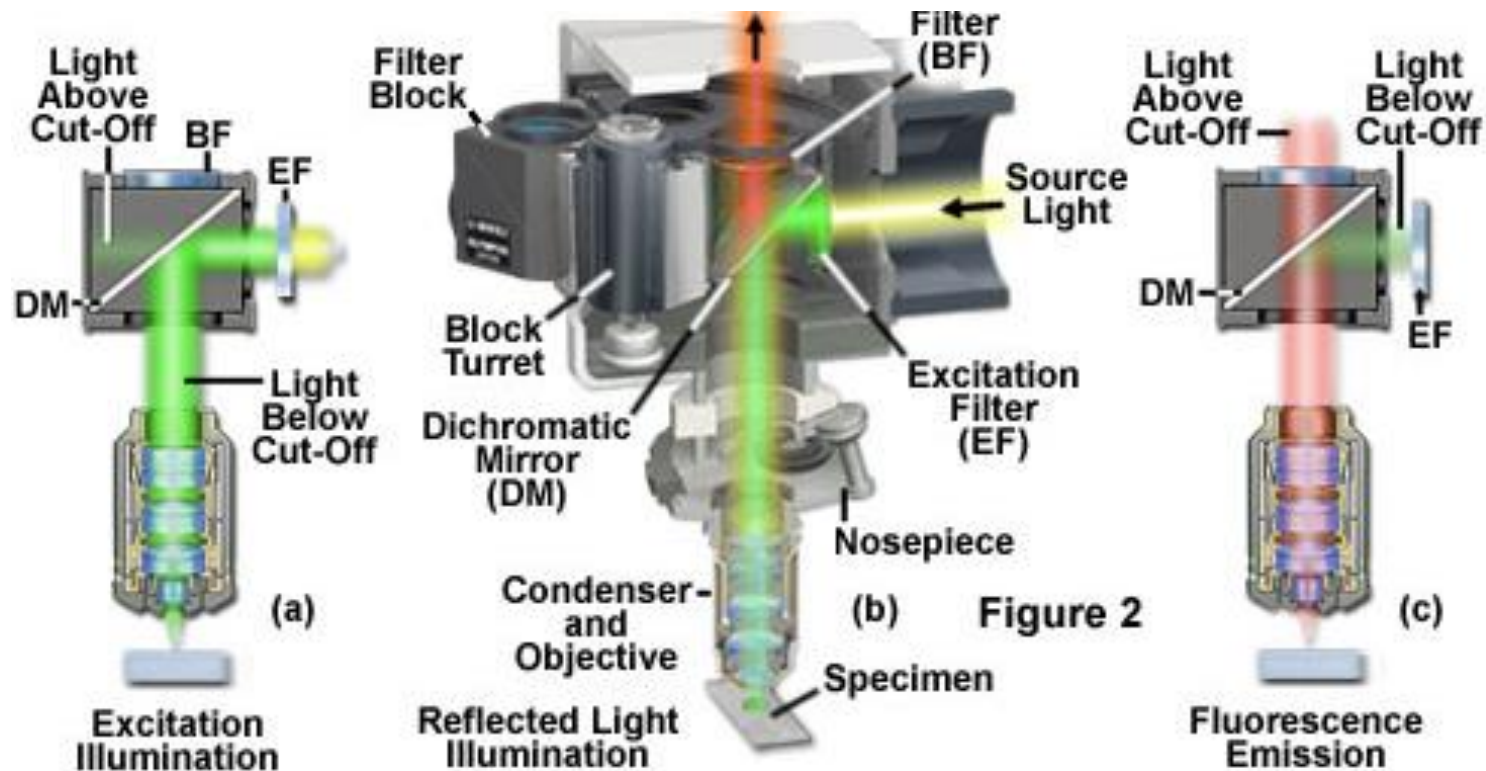
Invertovaný mikroskop  
objektiv zespodu



<https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/java/lightpaths/ix70fluorescence>



# Funkce dichroického zrcadla



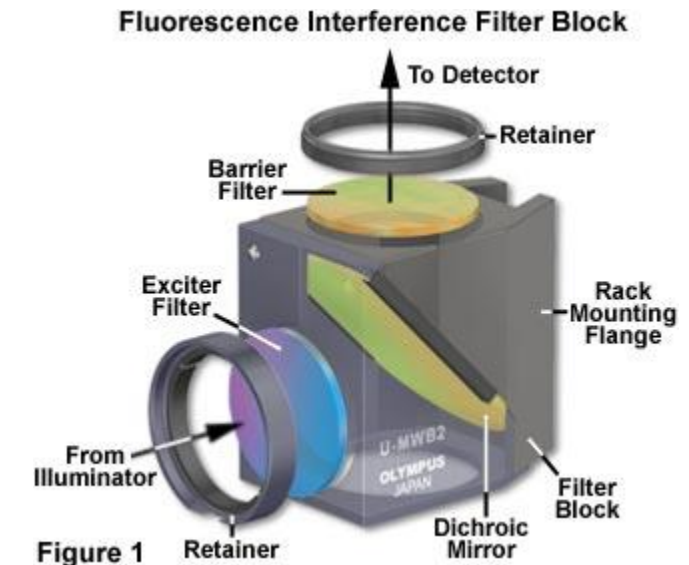
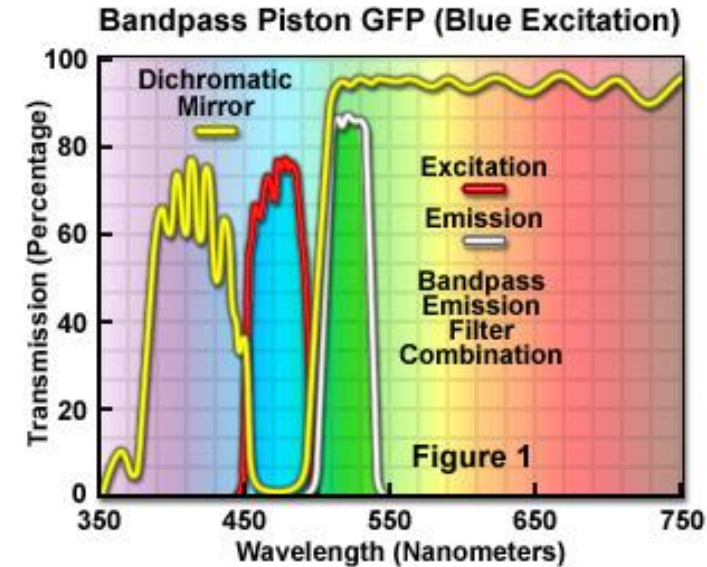
Dichroické zrcadlo propouští a odráží světlo podle toho, jakou má vlnovou délku.

Používá se vždy takový typ zrcadla, který odráží maximum excitačního světla a propouští maximum emisního světla podle excitačního a emisního maxima daného fluoroforu

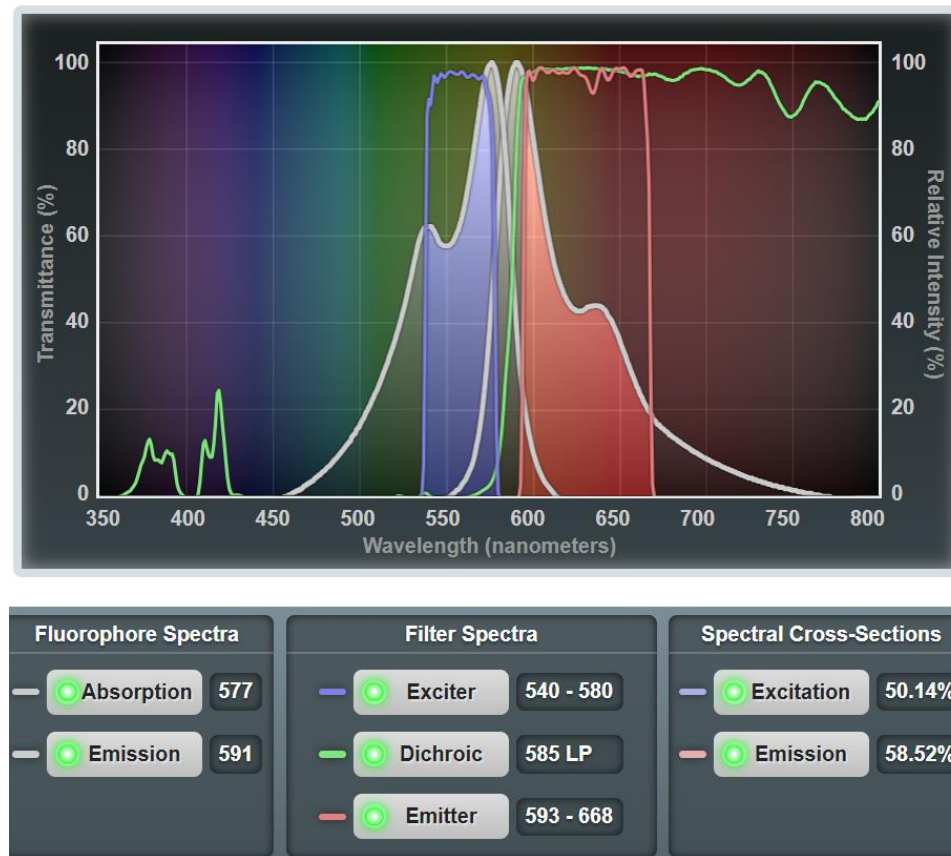
# Filtry

- Vhodná kombinace dichroického zrcadla, excitačního a emisního filtru pro použitý druh fluoroforu se do epifluorescenčního mikroskopu vkládá pohromadě jako tzv. **kostka**, jejíž dvě stěny jsou tvořeny filtry a úhlopříčka dichroickým zrcadlem. Kostky jsou umístěny na výměníku a je možné je vyměňovat podle potřeby.

<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/lightpaths/fluorescence/index.html>



# Výběr vhodného filtru pro fluorofor

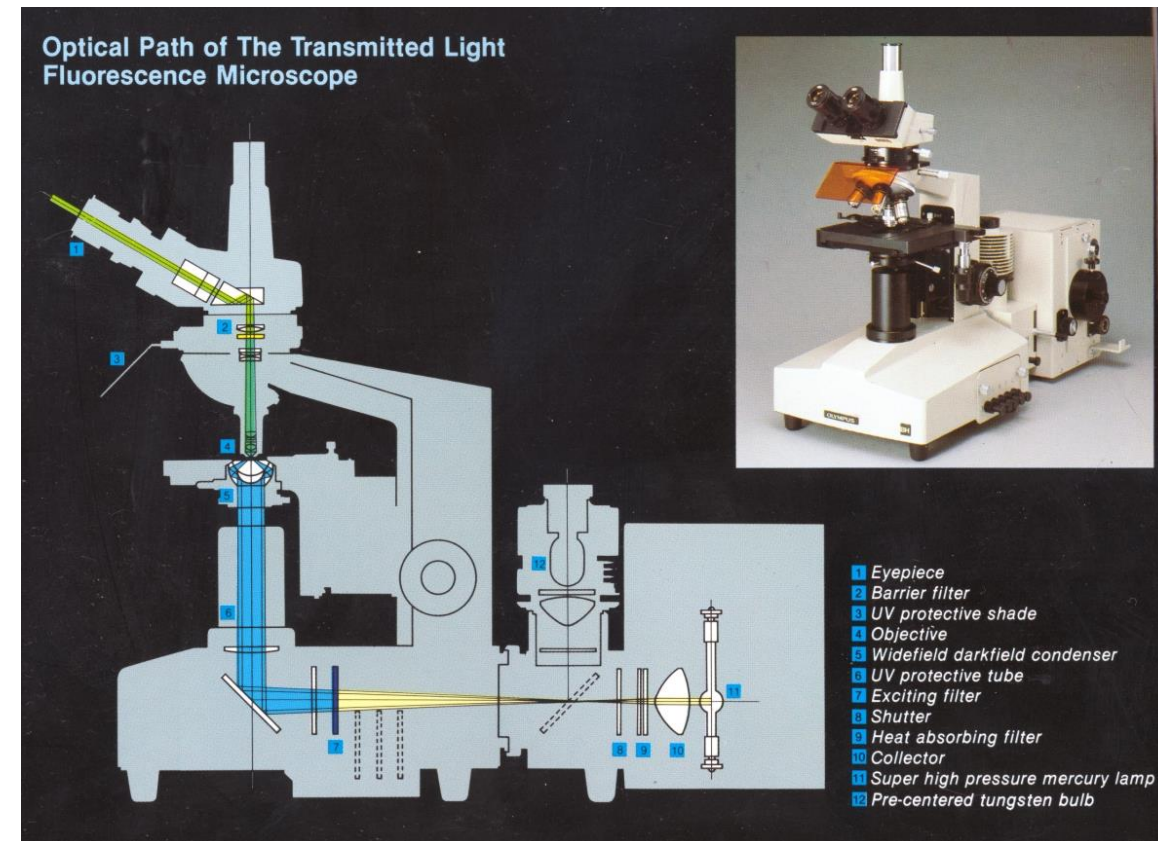


<https://www.microscopyu.com/tutorials/spectralprofiles>

# Transmisní fluorescenční mikroskop

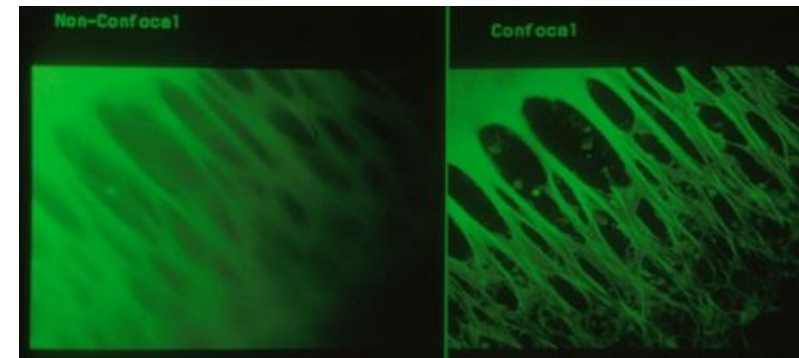
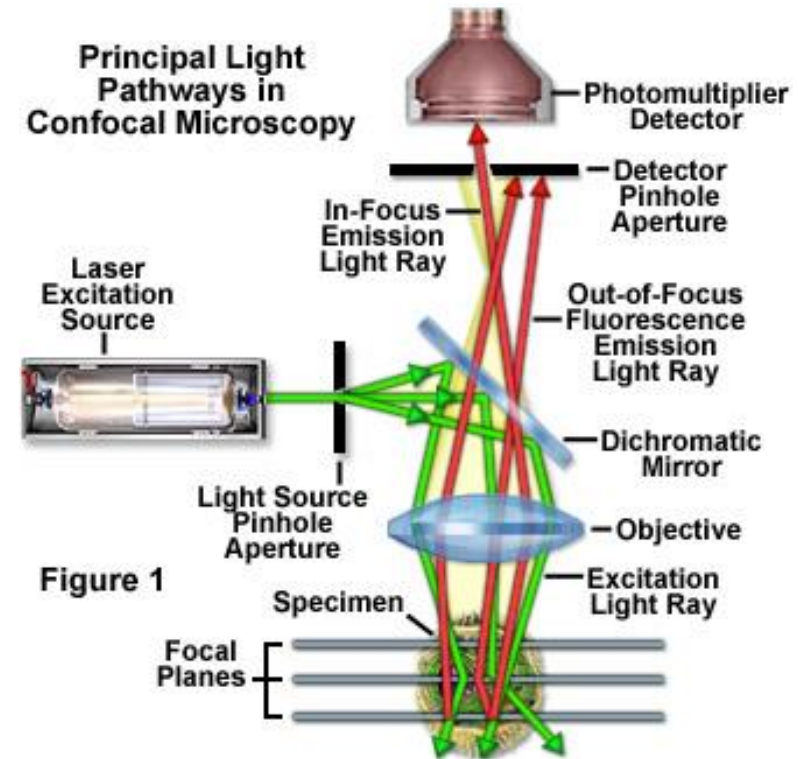
## Transmission fluorescence microscope

U tohoto typu mikroskopu prochází světlo excitačním filtrem a na preparát přichází zespodu jako u klasického světelného mikroskopu. Pro osvětlení preparátu se však používá **kondenzor zástinový**, který odráží světlo tak, že na preparát světlo dopadá z boku. Procházející excitační světlo tak prochází mimo objektiv a do objektivu se dostane emitovaná fluorescence.



# Konfokální mikroskop

- Konfokální mikroskop umožňuje odstranit z obrazu objektu šum, který vytváří světlo nebo fluorescence emitovaná z těch rovin vzorku, na které není zaostřena optika.
- Zdrojem světla je zpravidla **laser**, světlo prochází úzkou štěrbinou (source **pinhole**) a je zaostřeno do jednoho bodu vzorku. Světlo emitované z tohoto bodu je pak snímáno detektorem. Aby dopadlo na detektor, musí opět projít úzkou štěrbinou (detector **pinhole**), která leží v místě, kam objektiv zaměřuje světlo ze zaostřeného bodu objektu.
- Světlo emitované z osvětlených, ale nezaostřených bodů je fokusováno mimo štěrbinu a do detektoru nedopadá. Signál detektoru je odeslán do počítače, který zároveň dostává informaci o souřadnicích snímaného bodu.
- Tímto způsobem je bod po bodu proskenován celý objekt v různých optických rovinách. Toto skenování je automatizováno a ovládáno řídicím počítačem. Z nashromážděných informací počítač sestaví celkový obraz.



# Virtuální mikroskopie



<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/virtual/fluorescence/index.html>

<http://www.microscopyu.com/tutorials/java/kohler/index.html>

**Bi8920** Fluorescenční mikroskopie (doc. Neradil)

- Lakowicz J.R.: Principles of Fluorescence Spectroscopy. Third Edition, Springer + Business Media, New York, 2006.
- Fišar Z.: FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE V NEUROVĚDÁCH  
<http://www1.lf1.cuni.cz/~zfiisar/fluorescence/Default.htm>
- Poděkování:  
Grafika z knihy Principles o Fluorescence byla pro účely této přednášky laskavě poskytnuta profesorem J.R. Lakowitzem.